Marcus Vinicius Ferreira Magalhães
Luis Felipe Souza da Silva

EFEITO DO COMPORTAMENTO DO GATO NAS RESPOSTAS DEFENSIVAS E NOCICEPTIVAS DE RATOS

Ano 2024

Marcus Vinicius Ferreira Magalhães
Luis Felipe Souza da Silva

EFEITO DO COMPORTAMENTO DO GATO NAS RESPOSTAS DEFENSIVAS E NOCICEPTIVAS DE RATOS

Ano 2024

O conteúdo do texto e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Efeito do comportamento do gato nas respostas defensivas e nociceptivas de ratos

Diagramação: Ellen Andressa Kubisty
Correção: Andria Norman
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Autores: Marcus Vinicius Ferreira Magalhães
Luis Felipe Souza da Silva

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M188 Magalhães, Marcus Vinicius Ferreira
Efeito do comportamento do gato nas respostas defensivas e nociceptivas de ratos / Marcus Vinicius Ferreira Magalhães, Luis Felipe Souza da Silva. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2024.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-2436-9
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.369241004

1. Analgesia. 2. Dor. 3. Medo. 4. Ansiedade. I. Magalhães, Marcus Vinicius Ferreira. II. Silva, Luis Felipe Souza da. III. Título.

CDD 615.785

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao conteúdo publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que o texto publicado está completamente isento de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

DECLARAÇÃO DA EDITORA

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Felipe, que com muita sabedoria, serenidade e humildade, conduziu meus passos durante o mestrado, se tornando um exemplo de profissional e pessoa que tenho para toda a vida. Sem você, nada disso seria possível. Muito obrigado, professor!

Aos amigos de laboratório, Kelly Coutinho, Thiago Henrique, Tiago Costa, Amélia Gonçalves e Marcos Melo, pela contribuição em todas as etapas do trabalho, pelo empenho de vocês, pelos momentos de risadas e pela amizade de cada um. Vocês fazem parte disso!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas (PROCFIS), em especial, os professores Daniel Badauê, pela disposição, ensinamentos e conselhos sempre em boa hora e, Enilton Camargo, pela forma como conduz o Programa. Além disso, parabenizo ao Secretário do PROCFIS, Renivan, por desempenhar seu trabalho de forma exemplar.

Aos professores José Ronaldo, Murilo Marchioro, Adriana Gibara e Márcio Coutinho, por aceitarem contribuir na avaliação deste trabalho.

À Prof.ª Dr. ª Flávia Teixeira, pela disponibilização do LAFICO (Laboratório de Fisiologia do Comportamento) para que pudéssemos realizar nossos experimentos, reuniões, estudos e etc.

Aos animais, cujas vidas foram utilizadas em prol do desenvolvimento científico.

À UFS e ao PROCFIS, pela contribuição na minha formação acadêmica.

A todos os amigos que fiz na vida e que, de alguma forma, contribuíram para minha formação pessoal.

À minha mãe, Quitéria. Uma mulher guerreira que faz tudo pela família, um exemplo de mãe, minha heroína. Junto com meu pai, me educou, me deu amor, me acompanhou em todos os momentos e me mostrou os melhores valores de um ser humano, os quais eu procuro seguir. Te amo!

Ao meu pai, Marcos. Um homem honesto e batalhador. Meu ídolo, meu herói, meu amigo. Companheiro de todas as horas. Junto com minha mãe, me fez chegar até aqui. Te amo!

À minha irmã, Monisa, pela irmandade, preocupação, companheirismo e risadas. Junto com meu pai e minha mãe, formam a base familiar que tive, tenho e que levarei por toda a vida. Te amo!

À Camila, que além de me aconselhar e ouvir meus desabafos, me ajudou diretamente no trabalho, passando horas na frente do computador junto comigo. Esse trabalho também é seu.

A todos os meus familiares, desde os mais próximos aos mais distantes. Obrigado pela torcida. Em especial, a minha avó Nina, exemplo de ser humano, que acolhe a todos como filhos e que sempre me deu muito amor. Desejo-lhe muitos e muitos anos de vida pela frente. Te amo!

APRESENTAÇÃO

Este livro é um convite para o leitor compreender como o comportamento do gato influencia nas respostas defensivas e nociceptivas de ratos. Com isso, o presente livro traz para o leitor uma abordagem atualizada sobre a neuroquímica que há por trás da dor e do comportamento defensivo durante o confronto presa predador.

RESUMO

As respostas defensivas variam de acordo com a distância entre a presa e o predador e o grau de ameaça que cada situação oferece. Estudos sugerem que o confronto com o predador pode eliciar diferentes tipos de analgesia, bem como a ocorrência de ansiedade e medo. O nosso objetivo foi avaliar o efeito do comportamento do gato nas respostas defensivas e nociceptivas de ratos. Para tanto, foram utilizados 48 ratos Wistar com peso de 250 a 350 g. O experimento consistiu na avaliação das respostas defensivas de ratos dos grupos CTRL (sem a presença do gato), GAt (gato ativo) e GIn (gato inativo), N= 16 animais por grupo, divididos em grupos com ou sem a possibilidade de fuga para o abrigo na arena de teste comportamental, seguido do teste algesimétrico da placa quente para medir a influência da exposição ao gato na resposta nociceptiva dos ratos. No dia seguinte (dia 2), todos os animais voltaram à arena de teste comportamental para reexposição ao contexto aversivo (sem a presença do gato). Os grupos GAt (p< 0,01) e GIn (p= 0,03) apresentaram um tempo de congelamento significativamente maior que o CTRL, adicionalmente, os grupos GAt e GIn, apresentaram, respectivamente, menor tempo de rearing (p< 0,01; p= 0,02) e menor quantidade de cruzamento nos quadrantes (p< 0,01; p= 0,01), caracterizando uma menor atividade exploratória ou maior ansiedade. O grupo GAt apresentou resposta antinociceptiva no tempo 0, onde foi significativamente diferente do basal (p< 0,01) e do intervalo de tempo 60 (p= 0,01). No dia 2, o grupo GAt apresentou um tempo de congelamento significativamente maior que o grupo GIn (p= 0,04), paralelamente, os animais dos grupos GIn, sem a possibilidade de fuga para o abrigo, apresentaram um tempo de *rearing* (p= 0,01) e quantidade de cruzamentos nos quadrantes maiores que os grupos CTRL e GAt sem a possibilidade de fuga para o abrigo (p= 0,02; p< 0,02). O grupo GIn mostrou um número de tentativas ou avaliação de risco significativamente maior que o CTRL (p= 0,01). No dia 2, nenhum grupo apresentou resposta antinociceptiva significativa. Os resultados sugerem que o comportamento do gato tem influência direta na resposta comportamental e nociceptiva apresentada pelos ratos. Neste sentido, a presença de um gato ativo promoveu o aumento do tempo de congelamento, diminuiu a atividade exploratória, induziu respostas antinociceptivas em ratos e promoveu respostas de congelamento na reexposição dos ratos ao contexto aversivo.

PALAVRAS-CHAVE: analgesia, respostas defensivas, dor, medo, ansiedade

ABSTRACT

Defensive responses vary according to the distance between prey and predator and the degree of threat that every situation offers. Studies suggest that the confrontation with the predator produces different types of analgesia as well as, the occurrence of anxiety and fear. The evaluate the effect of exposure of rat to different aversive conditions in defensive and nociceptive responses was our pursue. Therefore, we used 48 Wistar male rats weighing 250 to 350 g. On day 1, defensive and nociceptive responses of CTRL (without the cat's presence), GAt (active cat) and GIn (inactive cat) groups was evaluated. It was N = 16 animals per group, divided into groups with or without the possibility of escape to the shelter in the behavioral test arena (5 min), followed by hot plate test to measure the nociceptive response of rats. The following day (Day 2), all animals were returned to behavioral testing arena, for 5 min, to re-exposure to aversive environment (without the presence cat). GAt ($p < 0.01$) and GIn ($p = 0.03$) groups had a significantly higher freezing time than CTRL. Additionally, GAt and GIn groups presented, respectively, shorter rearing ($p < 0.01$; $p = 0.02$) and fewer quadrants crossing ($p < 0.01$; $p = 0.01$). Farther, GAt group exhibited antinociceptive response at time 0, which was significantly different from baseline ($p < 0.01$) and interval time 60 ($p = 0.01$). Still on day 2, GAt group had significantly higher freezing than GIn group ($p = 0.04$), additionally, the animals of GIn group, without the possibility of escape to the shelter, had higher rearing duration ($p = 0.01$) and number of quadrants intersections than CTRL and GAt groups without the possibility of escape to the shelter ($p = 0.02$; $p < 0.02$). GIn group showed a higher number of risk assessment than CTRL ($p = 0.01$). On day 2, no group showed significant antinociceptive response. The results suggest that cat's behavior has a direct influence on behavioral and nociceptive response of rats. In this sense, the presence of an active cat promoted the increase in freezing duration, the decrease exploratory activity and it induced antinociception responses in rats, besides promoting freezing responses in them after a re-exposure to aversive context.

KEYWORDS: analgesia, defensive behavior, pain, fear, anxiety

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AV	Número de tentativas ou avaliação de risco
BSTMA	Porção antero medial do núcleo leito da estria
CDME	Corno dorsal da medula espinhal
CEPA	Comitê de ética em pesquisa animal
CTRL	Controle
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GIn	Gato inativo
GAt	Gato ativo
IASP	*International Association for the study of Pain*
LC	*Locus Coeruleus*
LTE	Labirinto em T elevado
MEA	Amígdala terminal
NADPH-d	Hidrogênio fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NDR	Núcleo dorsal da rafe
NMR	Núcleo magno da rafe
PMD	Núcleo pré-mamilar dorsal
pPVN	Núcleo paraventricular parvocelular
PQ	Placa quente
QC	Quantidade de quadrantes cruzados
RVM	Bulbo rostral ventro-medial
SCP	Substância cinzenta periaquedutal
SCPd	Substância cinzenta periaquedutal dorsal
SCPdl	Substância cinzenta periaquedutal dorso lateral
SCPvl	Substância cinzenta periaquedutal ventro lateral
TC	Tempo de congelamento
TPDL	Tegumento pontinho dorsolateral
TR	Tempo de *rearing*
TMT	Trimethythiazoline
UFS	Universidade Federal de Sergipe
VMHdm	Região dorsomedial do hipotálamo ventromedial
VMHvl	Região ventrolateral do hipotálamo ventromedial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3

2.1 Comportamento defensivo, medo e ansiedade. 3

2.2 Memória aversiva e medo ao contexto.. 4

2.3 Comportamento defensivo e modulação da dor 5

2.4 Modelos animais para estudo de comportamentos defensivos 6

2.5 Áreas neurais envolvidas na modulação dos comportamentos defensivos......8

2.6 Sistema descendente de analgesia endógena..10

2.7 Sistema rostrocaudal de facilitação da dor... 11

3. OBJETIVOS 13

3.1 Objetivo geral...13

3.2 Objetivos específicos...13

4. MATERIAL E MÉTODOS 14

4.1 Animais 14

4.2 Aparato para o teste comportamental..14

4.3 Teste comportamental 15

4.4 Análise comportamental 16

4.5 Teste algesimétrico da placa quente 16

4.6 Protocolo Experimental..17

4.7 Análise dos Resultados..18

5. RESULTADOS 20

5.1 Efeito do comportamento do gato e da possibilidade de fuga nas respostas comportamentais defensivas de ratos.. 20

5.1.1 Tempo de Congelamento (TC) 20

5.1.2 Tempo de *Rearing* (TR).. 21

5.1.3 Quantidade de quadrantes cruzados (QC).......................................23

5.1.4 Número de tentativas ou avaliação de risco (AR)..............................24

INTRODUÇÃO

As respostas comportamentais defensivas apresentadas podem variar de acordo com alguns fatores, tais como, a distância entre a presa e o predador (RATNER, 1967) e a avaliação do grau de ameaça que cada situação oferece (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988). Assim que identificado o perigo (presença do predador) e este estando distante, a resposta apresentada pela presa, frequentemente, é o congelamento (*freezing*). Com a redução da distância entre a presa e o predador, a presa normalmente inicia respostas de fuga e, com uma proximidade maior entre os dois, respostas de luta podem ser executadas. Finalmente, após ter sido capturada pelo predador algumas espécies emitirão ainda o comportamento de imobilidade tônica (RATNER, 1967; RODGERS e RANDALL, 1987).

Durante a execução dos comportamentos defensivos, é fundamental que ocorra a ativação de sistemas analgésicos endógenos os quais permitem ao animal a realização dessas estratégias comportamentais de maneira adequada. Nesse sentido, BOLLES e FANSELOW (1980) sugeriram que a ativação dos mecanismos antinociceptivos representaria parte importante dos sistemas defensivos, já que a diminuição da sensibilidade nociceptiva permitiria que o animal ameaçado executasse os comportamentos defensivos, como congelamento, fuga e luta, sem o impedimento causado pela motivação de atender a injúria e iniciar respostas recuperativas. Isso é particularmente importante, pois durante encontros com predadores ou co-específicos agressivos, é provável que ocorram lesões corporais. Assim, alguns trabalhos mostram a ocorrência de antinocicepção associada a situações que desencadeiam reações de defesa, tais como a detecção de odores de co-específicos estressados (JENSEN e SMITH, 1982), a presença do predador natural (LESTER e FANSELOW, 1985) e o ato da predação (KROMER e DUM, 1980).

Além disso, Rodgers e Randall (1987) propuseram que o tipo de analgesia apresentada durante um comportamento defensivo dependeria do tipo de resposta apresentada. Nesse contexto, respostas como a fuga ou luta apresentariam analgesia do tipo não-opióide e comportamentos defensivos de imobilidade, tais como congelamento ou imobilidade tônica, cursariam com analgesia do tipo opióide (Rodgers e Randall, 1987). Sendo assim, é possível que exista uma relação entre a resposta comportamental defensiva e o tipo de antinocicepção.

Experimentalmente, diversos modelos laboratoriais têm sido usados no estudo das reações de defesa. Neste sentido, estudos que expõem animais de laboratório a estímulos aversivos semelhantes aos encontrados na natureza, tais como: exposição ao predador vivo (BEIJAMINI e GUIMARAES, 2006; BLANCHARD et al. 1990; CANTERAS e GOTO, 1999; COMOLI et al. 2003), ao odor do predador (BLANCHARD et al., 1990; DIELENBERG et al. 2001) ou a um co-específico agressivo (MICZEK et al. 2004), são capazes de eliciar comportamentos defensivos a partir de um estímulo etologicamente relevante. A associação desses modelos experimentais a técnicas de microinjeção central de drogas,

neurotraçamento e a lesões e estimulações eletroquímicas do sistema nervoso central tem contribuído no estudo dos substratos neurais e neurotransmissores envolvidos com a expressão dos comportamentos defensivos.

Neste sentido, uma vez que as respostas defensivas variam com o grau de ameaça de cada situação e que a antinocicepção apresentada tem relação com o comportamento defensivo apresentado, o nosso objetivo com o presente trabalho foi avaliar como o comportamento do gato e a possibilidade de fuga influenciariam no comportamento defensivo e na resposta nociceptiva de ratos.

Diante do exposto, nossa hipótese é de que o comportamento defensivo e a resposta nociceptiva apresentada pela presa (ratos) dependerá do comportamento do predador (gato) e das características do ambiente, ou seja, da existência ou não da possibilidade de fuga. Além disso, a reexposição dos ratos ao contexto aversivo, deverá induzir comportamentos defensivos e alterações na sensibilidade dolorosa associada a esta.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COMPORTAMENTO DEFENSIVO, MEDO E ANSIEDADE.

Estudos que analisam o comportamento defensivo em ratos e camundongos contribuem de forma significativa para a compreensão das bases neurais relacionadas aos transtornos de medo e ansiedade. Além disso, as estratégias defensivas utilizadas por animais de laboratório em diferentes níveis de ameaça podem ser relacionadas a estados emocionais distintos (MARKS, 1987; BLANCHARD, 1988; GRAY e MCNAUGHTON, 2000; GRAEFF e ZANGROSSI, 2002).

As respostas comportamentais defensivas podem variar de acordo com alguns fatores, tais como, da distância entre o predador e a presa (RATNER, 1967) e da avaliação do grau de ameaça que cada situação oferece (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988).

Os Blanchard, em 1988, classificaram o tipo de estratégia defensiva adotada pela presa (roedor) de acordo com o nível de ameaça, que pode ser: potencial, distal e proximal. Assim, quando há uma ameaça potencial, as estratégias observadas são comportamentos exploratórios cautelosos e hesitantes com a realização de movimentos corporais que permitem a aproximação e a investigação da possível ameaça, denominados de comportamentos de avaliação de risco. Uma ameaça distal está associada aos comportamentos de fuga, onde o animal tenta escapar da situação de confronto com o predador, porém, precisa existir uma rota de saída no ambiente. Na ameaça distal, ainda pode ocorrer o comportamento de congelamento, no qual o animal permanece imóvel, caso a fuga não seja viável e/ou o predador mantenha ainda certa distância. O nível proximal ocorre quando o predador está em contato direto ou a pequena distância do animal, nesses casos, observam-se comportamentos defensivos como: tentativas não direcionadas e descontroladas de fuga ou luta defensiva, onde o animal mantém postura de ameaça e pode até morder o predador. Ainda em uma ameaça proximal, algumas espécies emitem o comportamento defensivo de imobilidade tônica, após terem sido capturadas pelo predador (RATNER, 1967; RODGERS e RANDALL, 1987).

De acordo com BLANCHARD et al. (1990), o medo surge diante de situações claras e evidentes de ameaça e perigo real ou aparente, já a ansiedade é desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, incerto e vago, contudo, os dois estados emocionais diferem em relação aos estímulos ou situações desencadeadoras do medo ou ansiedade. Neste sentido, o comportamento defensivo em situações de medo ou pânico e de ansiedade são diferentes (BLANCHARD et al. 1993). Os comportamentos representativos do medo ou pânico (fuga e congelamento) são desencadeados quando o estímulo ou a situação ameaçadora são reais, como a presença do predador, enquanto os representativos de ansiedade (avaliação de risco) seriam desencadeados por estímulos ou situações apenas potencialmente ameaçadoras como o odor do predador.

Ao longo dos anos, no que tange as respostas de ansiedade e medo associadas a comportamentos defensivos, diversos estudos foram desenvolvidos. BLANCHARD e colaboradores (1990) observaram que em uma pista reta contendo odor de gato, ratos apresentaram alto índice de avaliação de risco, que é um comportamento defensivo característico de ansiedade e, que o diazepam e o etanol foram capazes de diminuir significativamente tal comportamento.

ADAMEC e SHALLOW (1993) observaram que uma única exposição a um gato, aumentou a ansiedade de ratos no labirinto em cruz elevado de 1 a 21 dias e que a gravidade da ansiedade produzida teve influência do comportamento do gato. Mais recentemente, BULOS et al. (2015) mostraram que uma exposição de apenas 5 minutos a um gato vivo, produziu um efeito ansiogênico nos testes do labirinto em cruz elevado e labirinto em T, caracterizado pela aquisição de esquiva inibitória, que é associada a ansiedade generalizada. Tal resposta foi bloqueada pela administração de diazepan, que possui ação ansiolítica.

2.2 MEMÓRIA AVERSIVA E MEDO AO CONTEXTO

As memórias aversivas são fundamentais para a sobrevivência de um indivíduo. No condicionamento aversivo, observa-se uma associação entre um estímulo incondicionado, como, por exemplo, um choque elétrico, e um estímulo neutro, como o toque de uma campainha pareada ao choque elétrico. A partir da combinação desses estímulos, o estimulo neutro adquire capacidade de eliciar respostas incondicionadas. No condicionamento ao contexto, o ambiente pode ser associado ao estímulo incondicionado, neste caso, com um choque elétrico, passando a eliciar respostas aversivas (REIS et al. 1999; KUNZE et al. 2015).

O condicionamento aversivo demonstra ser um tipo de aprendizagem envolvendo relações de controle de estímulo, onde, o estímulo aversivo sinaliza a apresentação de outro estímulo, gerando respostas defensivas. Assim, a apresentação apenas do contexto aversivo pode induzir respostas de congelamento ou de potenciação de comportamentos exploratórios (PILZ e SCHNITZLER, 1996). A aprendizagem no condicionamento aversivo, geralmente, é avaliada pelo comportamento de congelamento que ocorre durante a exposição ao contexto (HITCHCOCK e DAVIS, 1991). Os estudos que abordam o condicionamento aversivo, geralmente, são referidos como condicionamento do medo, baseado no fato de que o comportamento de congelamento faz parte das respostas defensivas de roedores e outros animais (KUNZE et al. 2015; BRANDE-EILAT et al. 2015; FERRARI et al. 1999). Além disso, o medo ao contexto em roedores, pode ser induzido pela exposição a estímulos predatórios ou aversivos, como por exemplo: odor predatório, co-específico agressivo, predador natural e choque ao pé (VIELLARD et al. 2016; SILVA et al. 2013).

Com relação ao substrato neural, estudos mostram que o hipocampo e a amígdala estão envolvidos no condicionamento do medo contextual (ANTONIADIS e MCDONALD, 2000; ZHANG et al. 2001; RABINAK e MAREN, 2008). Mais recentemente, VIELLARD et al. (2016) mostraram que ratos que retornaram ao contexto, onde no dia anterior receberam choque ao pé, apresentaram aumento na expressão de c-Fos em áreas como: núcleo central da amígdala e substância cinzenta periaquedutal ventrolateral (SCPvl). Já ZHOU et al. (2016) mostraram que o hipocampo intacto é necessário para a formação de memória remota e que o hipocampo unilateral é suficiente para a formação memória recente do medo contextual.

2.3 COMPORTAMENTO DEFENSIVO E MODULAÇÃO DA DOR

Durante a execução dos comportamentos defensivos, é fundamental que ocorra a ativação de sistemas analgésicos endógenos, os quais permitem ao animal a realização dessas estratégias comportamentais de maneira adequada. Nesse sentido, BOLLES e FANSELOW (1980) sugeriram que a ativação dos mecanismos antinociceptivos representaria parte importante dos sistemas defensivos, já que a diminuição da sensibilidade nociceptiva permitiria que o animal ameaçado executasse os comportamentos defensivos, como congelamento, fuga ou luta, sem o impedimento causado pela motivação de atender a injúria e iniciar respostas recuperativas. Isso é particularmente importante, pois, durante o encontro com predadores ou co-específicos agressivos, é provável que ocorram lesões corporais.

Segundo RODGERS e RANDALL (1987), apesar da ocorrência de antinocicepção durante as reações de defesa, é improvável que a analgesia associada à resposta de fuga ativa e a associada às respostas de imobilidade sejam mediadas de modo semelhante, já que a forma ativa/passiva e a função de evitar a captura ou reduzir o interesse do predador pela presa são obviamente muito diferentes. Sendo assim, o tipo de analgesia (opióide ou não opióide) depende da natureza do estímulo e também da reação defensiva desencadeada. De fato, durante uma resposta de defesa ativa, como a fuga ou luta, a analgesia parece ser do tipo não-opióide, de duração rápida (± 10 min). Por outro lado, durante as respostas de imobilidade (congelamento e imobilidade tônica), resposta defensiva passiva, a analgesia seria do tipo opióide, de duração mais prolongada (± 40 min) (RODGERS e RANDALL,1987).

Estudos anteriores mostraram a ocorrência de antinocicepção associada a situações que desencadeiam reações de defesa. JENSEN e SMITH (1982) mostraram que a latência, no teste da retirada da cauda, aumentou em ratos que testemunharam co-específicos recebendo choques nas patas. Possivelmente, isso se deu pela detecção de odores desses co-específicos estressados, constatando a existência de analgesia endógena nessa situação. Posteriormente, foi visto que a analgesia produzida foi bloqueada com

administração de um antagonista opióide (naloxona 10mg/kg). Já LESTER e FANSELOW (1985) observaram que ratos expostos a um gato diminuíram a resposta nociceptiva no teste da formalina, e que essa redução da nocicepção foi revertida completamente e parcialmente quando administrado respectivamente os antagonistas opióides naltrexona e naloxona. KROMER e DUM (1980) mostraram que ratos que apresentavam comportamento de "*Mouse-killing*" tiveram um aumento do limiar nociceptivo no teste da placa quente e que esse efeito foi prevenido pela administração de um antagonista opiáceo. Esses conjuntos de dados indicam o envolvimento de mecanismos opióides nas alterações do limiar nociceptivo associada ao comportamento agressivo.

A relação entre perigo e antinocicepção parece ser esclarecida em alguns estudos. De acordo com HARRIS (1996), estudos anteriores já mostravam que, enquanto os sinais de perigo, que preveem um evento aversivo, promovem respostas antinociceptivas, sinais de segurança, que indicam a inexistência de evento aversivo, promovem bloqueio da resposta antinociceptiva, chegando a reverter os efeitos analgésicos da morfina sistêmica (WIERTELAK et al. 1992).

O medo desempenha um papel crítico em respostas antinociceptivas induzidas ambientalmente, além disso, existem evidências de que algumas respostas antinociceptivas são dependentes da excitação pelo medo e várias demonstrações de respostas nociceptivas frente ao perigo inato ou aprendido (BLANCHARD e BLANCHARD, 1972; BOLLES e FANSELOW, 1980).

A exposição de ratos (*Peromyscus leucopus*) por trinta segundos a um predador natural (*Mustela erminea*) resultou em respostas antinociceptivas, sendo estas, bloqueadas pela administração prévia de benzodiazepina (10 mg / kg) ou o diazepam (4,0 mg/kg) e não bloqueadas pelo antagonista opióide, naloxona. Com 5 minutos de exposição, tanto a benzodiazepina quanto o naloxona bloquearam a resposta nociceptiva. Já com 15 minutos de exposição, apenas o naloxona conseguiu bloquear a resposta nociceptiva (KAVALIERS, 1988). Por outro lado, HELMSTETTER (1992) observou que lesões eletrolíticas na amigdala de ratos aboliu o congelamento e hipoalgesia associados ao medo contextual, indicando a participação da amígdala na ativação dos sistemas antinociceptivos descendentes em resposta a estresse ambiental.

2.4 MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DE COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS

Ao longo dos anos, diversos modelos animais foram desenvolvidos para investigar o comportamento defensivos de mamíferos frente a diversos estímulos aversivos.

Em 1990, BLANCHARD e colaboradores caracterizaram o comportamento defensivo de ratos expostos ao seu predador natural em um sistema de tocas que tinha muitas características do habitat natural de ratos. Eles observaram que um conjunto

diferente de comportamentos defensivos foi visto quando os ratos foram confrontados por um predador fora da toca. Fuga para a toca e congelamento dentro da toca foram seguidos por investigação ativa da superfície onde o gato foi visto (avaliação de risco) e todos estes comportamentos foram acompanhados pela inibição de comportamentos não-defensivos, como: comer, beber, comportamento sexual e agressão.

Com base nesta análise, diversos modelos animais foram desenvolvidos para se obter respostas mais aprofundadas sobre o assunto, um deles foi o de SHEPHERD et al. (1993), onde eles avaliaram a relação ansiedade e resposta defensiva. Para isso, eles expuseram ratos e ratas ao predador natural (gato) ou ao odor do gato em uma caixa com dois compartimentos e um túnel, que permite a movimentação do rato entre os compartimentos, e observaram alguns parâmetros como: evitação ao gato, posição de agachamento, exploração da área, comportamentos de avaliação de risco e comportamentos não-defensivos (comer, beber). Como resultado, eles viram que as atividades não-defensivas, o tempo no compartimento próximo ao gato e a exploração da área, diminuíram. Enquanto que o tempo de agachamento e avaliação de risco aumentaram. Em todos os resultados, as fêmeas apresentaram resposta defensiva mais acentuada que os machos.

O teste do labirinto em T elevado (LTE) é um modelo experimental que separa comportamentos defensivos, como a esquiva inibitória e avaliação de risco (relacionados com transtornos de ansiedade generalizada) e a fuga (relacionada com transtornos de medo ou pânico). Na sessão experimental, o rato executa duas funções: esquiva inibitória e respostas de fuga de sentido único. (GRAEFF et al., 1993; GRAEFF e ZANGROSSI 2002). O LTE surgiu da necessidade de se explicar o papel controverso da serotonina na ansiedade. De acordo com GRAEFF (1991), os comportamentos defensivos de esquiva inibitória e fuga no LTE recrutam diferentes áreas e circuitos neurais. Enquanto a fuga é proveniente da ação da serotonina vinda por fibras nervosas do núcleo dorsal da rafe (NDR) em receptores 5-HT presente em estruturas, tais como: a amígdala e o córtex pré-frontal, a esquiva inibitória é produzida a partir da serotonina, liberada em receptores 5-HT na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) por fibras também originárias no NDR.

Nos últimos anos, diversos modelos animais têm sido desenvolvidos para se estudar o comportamento defensivo de presas quando expostas ao estímulo predatório. Neste sentido, SILVA et al. (2013) construíram um modelo animal que consiste num teste comportamental, onde padrões semelhantes de comportamento de medo são extraídos de camundongos expostos ao predador (rato predatório), rato (co-específico) agressivo ou um choque elétrico no pé. O aparelho usado para o teste, consistia de duas câmaras separadas por um corredor estreito. O rato era confinado em uma das câmaras e exposto a um rato predatório, um co-específico agressivo, um choque pé ou um rato de brinquedo. No outro dia, os ratos tinham o acesso livre ao corredor e a segunda câmara, mas dessa vez com ausência de ameaça. Neste modelo, pôde ser estudado as respostas de medo no primeiro dia e, na reexposição, pôde-se avaliar o medo contextual.

Recentemente, BULOS et al. (2015) criaram um modelo que avalia respostas defensivas (como a esquiva inibitória e fuga, características de ansiedade e medo respectivamente) no labirinto em T e no labirinto em cruz elevado, após os ratos terem sido expostos a um gato. O objetivo foi avaliar o efeito da exposição ao predador nas respostas defensivas características de medo e ansiedade. Já SIEVERT e LASKA (2016) desenvolveram um modelo animal, no qual expuseram ratos a sete tipos de odores isolados que fazem parte dos componentes químicos da urina, fezes e secreções das glândulas anais de seus predadores naturais, onde eles avaliaram a ansiedade e o estresse a partir de respostas como: comportamento de evitamento, atividade motora geral e o número de bolos fecais excretados. Como resultado, eles viram que dois odores provocaram comportamento de evitamento nos ratos e nenhum odor provocou alteração na atividade motora geral e no número de bolos fecais excretados.

BLANCHARD et al. (2016) desenvolveu um modelo de estudo comportamental em condições ambientais, com o objetivo de investigar o uso do habitat por coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) que enfrentam ameaça de predação por gatos selvagens. Para isso, eles escolheram uma área coberta por *Poa annua*, que é a vegetação de preferência dos coelhos da região, e com montes de areia que permitiam que os coelhos e gatos ficassem fora do campo visual um do outro. Como resultado, os coelhos pastaram mais em algumas áreas, desobstruindo e passando mais tempo nestas, possivelmente para terem opções de fuga durante um possível ataque, sugerindo que os gatos influenciam fortemente o uso do habitat por coelhos daquela região. Contudo, mesmo com essa diversidade de modelos animais que tentam explicar os vários tipos de comportamento defensivo de acordo com o estímulo predatório, nenhum estudo avaliou o efeito da resposta comportamental do predador e das condições ambientais (chance de fuga ou não) na resposta comportamental defensiva e nociceptiva apresentada pela presa.

2.5 ÁREAS NEURAIS ENVOLVIDAS NA MODULAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS.

Experimentalmente diversos modelos laboratoriais foram desenvolvidos para o estudo das reações de defesa. Neste sentido, o uso do predador natural tem sido utilizado por diversos grupos para estudar a circuitaria neural envolvida com respostas de medo. CANTERAS e GOTO (1999) examinaram a distribuição de neurônios que expressam Fos nas diversas regiões da substância cinzenta periaquedutal (SCP) de ratos expostos a um predador natural. Assim, após o encontro com o predador, um conjunto de células imunorreativas para Fos foi observado nas regiões dorsomedial e dorsolateral da SCP rostral e nas regiões lateral e ventrolateral da SCP caudal. Por outro lado, ratos expostos a um gato vivo ou gato de brinquedo tiveram aumento significativo na porcentagem de neurônios duplamente marcados para proteína c-fos e NADPH-d em regiões como a porção

anteromedial do núcleo leito da estria terminal (BSTMA), amígdala medial (MEA), núcleos periventricular parvocelular (pPVN) e pré-mamilar dorsal (PMd), núcleos hipotalâmicos, substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl) e núcleo dorsal da rafe (BEIJAMINI e GUIMARÃES, 2006).

Outro estudo comparou o padrão de expressão de c-Fos na SCP de ratos expostos ao predador vivo (gato) ou durante o comportamento de predação de insetos (COMOLI et al. 2003). Neste sentido, a exposição ao predador causou um aumento a expressão de c-Fos na SCP, onde, em níveis rostrais, a expressão de Fos estava distribuída nas regiões dorsomedial e dorsolateral, ao passo que, caudalmente, a expressão de neurônios Fos positivos era principalmente nas áreas laterais e ventrolateral da SCP, bem como no núcleo dorsal da rafe. Por outro lado, a resposta de predação foi associada com o aumento da expressão de Fos predominantemente nos dois terços rostrais da SCP lateral.

Adicionalmente, ratos expostos ao odor predatório (gato) mostraram maior expressão de Fos que seus controles, mais especificamente, na amígdala medial póstero ventral, no núcleo pré-mamilar (parte dorsal), no núcleo do hipotálamo ventromedial (parte dorsomedial), no núcleo do hipotálamo dorsomedial, na SCP (dorsomedial, dorsolateral e áreas ventrolaterais) e no núcleo cuneiforme (DIELENBERG et al. 2001).

Estudos mostraram que a estimulação elétrica da SCP dorsal produz comportamentos semelhantes a ataques de pânico (característicos de medo) em pacientes submetidos à neurocirurgia (AMANO et al. 1978; NASHOLD et al. 1969). Já GRAEFF (1991) observou que a esquiva inibitória (comportamento defensivo relacionado com a ansiedade) é produzida a partir da serotonina, liberada em receptores 5-HT na SCP dorsal. Por fim, a microinjeção de aminoácidos excitatórios ou drogas que inibem a neurotransmissão mediada pelo ácido gama amino butírico (GABA), na SCP dorsal de ratos, evocou respostas de fuga abruptas, juntamente com alterações cardiovasculares que lembram um ataque de pânico (BECKETT e MARSDEN 1995; SCHENBERG et al. 2001). Contudo, foi observado que a SCP modula respostas defensivas de acordo com estímulos aversivos de medo ou ansiedade.

Em estudo com primatas, FORCELLI et al. (2016) mostraram que ativação do colículo superior resultou no surgimento de comportamentos de defesa, como o encolhimento, fuga e vocalizações defensivas. Este efeito foi observado em paralelo com a diminuição das interações sociais. Em contrapartida, a inativação da amígdala basolateral atenuou significativamente o comportamento de encolhimento. Quando a inativação na amígdala basolateral foi concomitante a ativação do colículo superior, houve atenuação no comportamento de encolhimento, enquanto que os comportamentos de fuga e vocalizações defensivas estiveram presentes.

Para investigar se os padrões de ativação neural induzidos por choque nas patas, exposição ao predador ou co-específico agressivo envolvem áreas distintas no hipotálamo, SILVA et al. (2013) realizaram um mapeamento em diferentes regiões do hipotálamo de ratos com marcação de c-Fos. Em particular, a exposição ao predador ativou significativamente a

região dorsomedial do hipotálamo ventromedial (VMHdm), enquanto que a exposição a uma mesma espécie agressiva ativou significativamente a região ventrolateral do hipotálamo ventromedial (VMHvl). Por sua vez, os ratos expostos a choque nas patas não mostraram ativação no hipotálamo ventromedial, indicando que o hipotálamo medial é seletivamente recrutado durante à exposição ao predador e medo social e que os comportamentos de medo semelhantes recrutam diferentes circuitos cerebrais.

Mais recentemente, VIELLARD et al. (2016) investigaram as áreas neurais envolvidas em diferentes comportamentos defensivos no medo contextual. Eles observaram que tanto os animais que apresentaram comportamento de avaliação de risco, como os animais que mostraram comportamento de congelamento, tiveram ativação de c-Fos na amígdala central e SCPvl. Porém, ao analisarem a expressão de c-fos em regiões do circuito septo-hipocampo-hipotálamo, eles observaram maior expressão nas regiões justadorsomedial da área hipotalâmica lateral, no núcleo pré-mamilar dorsal e na SCP lateral e dorsomedial em animais que mostraram comportamento de avaliação de risco.

2.6 SISTEMA DESCENDENTE DE ANALGESIA ENDÓGENA

A dor é uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos desse potencial dano (IASP, 2010).

Segundo SILVA e OLIVEIRA (2006), a dor é importante para preservar a integridade física do indivíduo, porém, em situações de estresse intenso e perigo, é frequente a ocorrência de analgesia endógena, impedindo que a dor comprometa o seu desempenho durante a situação de risco. REYNOLDS (1969) evidenciou a participação de uma estrutura do sistema nervoso central na produção de analgesia. Ele viu que a estimulação elétrica do tronco encefálico, incluindo a substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo (SCP) de ratos, permitiu a realização de uma cirurgia abdominal sem nenhum tipo de anestesia, onde os animais não demonstraram manifestação comportamental ou motora da dor.

Nas décadas de 1970 e 1980, muitos trabalhos evidenciaram o papel fundamental de algumas estruturas do tronco encefálico na modulação da resposta nociceptiva, as principais estruturas são a SCP, o locus coeruleus (LC) e o Bulbo rostral ventromedial (RVM), que inclui o núcleo magno da rafe (NMR) (YAKSH, 1984; YAKSH, 1978; JONES e GEBHART 1988; GEBHART, 1986). Essas estruturas, quando ativadas, se comunicam e medeiam impulsos rostrocaudais que inibem a transmissão nociceptiva nos neurônios do corno dorsal da medula espinal (CDME). Assim, a SCP ventrolateral, quando estimulada eletricamente ou por substâncias como o glutamato ou morfina, estimula neurônios do RVM que, por sua vez, emitem axônios para o CDME através do funículo dorso lateral e liberam principalmente serotonina. Os neurônios do CDME possuem receptores para serotonina (5-HT) e noradrenalina, o que culmina na inibição do neurônio de segunda ordem que conduz o estímulo nociceptivo, resultando na antinocicepção (AIRMONE et al. 1987; JENSEN e YAKSH, 1984).

Fisiologicamente, a SCP pode ser ativada por informações provenientes de áreas do sistema límbico, como amígdala, hipotálamo e córtex cingulado anterior, desencadeadas durante situações de estresse, medo (respostas afetivas de caráter aversivo), exercício intenso e durante o confronto com o predador. Essa ativação depende da liberação de peptídeos opióides endógenos em situações de perigo, defesa, estresse e medo, provavelmente pelas estruturas do sistema límbico citadas anteriormente. Tanto a SCP quanto o RVM possuem receptores opioidérgicos, principalmente do tipo μ, onde os opióides endógenos se ligam e ativam o sistema inibitório rostrocaudal antinociceptivo e promove a analgesia. Apesar do RVM ser a principal fonte de serotonina para o CDME, tal estrutura também apresenta grande proporção de células não-serotoninérgicas, incluindo aquelas que contém encefalina, somatostatina, glutamato, substância P, GABA, colecistocinina e que também geram projeções para medula espinal (JONES et al. 1991; BOWKER et al., 1988; MINSON et al. 1991; BOWKER et al. 1983; MANTHY e HUNT, 2002).

O RVM e SPC ventrolateral também emitem projeções para outra estrutura do tronco encefálico, o tegumento pontino dorsolateral (TPDL), que uma vez ativado, emite axônios para o CDME e libera noradrenalina promovendo a antinocicepção (JONES, 1992; PROUDFIT, 1988; CLARK e PROUDFIT, 1991; BAJIC e PROUDFIT, 1999). O locus coeruleus e o TPDL são as principais estruturas do tronco encefálico responsáveis pela antinocicepção noradrenérgica em ratos (JONES, 1992; PROUDFIT, 1988; CLARK e PROUDFIT, 1991; GEBHART, 1986).

Em estudo recente, CAMPION et al. (2016) avaliaram se a SCP ventrolateral (SCPvl) e o núcleo dorsal da rafe (NDR), estruturas do tronco encefálico, são sistemas antinociceptivos distintos. Esta hipótese foi testada através da determinação da potência antinociceptiva da microinjeção de morfina em cada estrutura. A antinocicepção ocorreu após 94% das injeções de morfina na SCP ventrolateral, enquanto que apenas 68,3% e 78,3% das injeções nos aspectos lateral e medial do NDR produziram antinocicepção. Estes dados indicaram que o SCP ventrolateral e NDR são estruturas antinociceptivas distintas.

2.7 SISTEMA ROSTROCAUDAL DE FACILITAÇÃO DA DOR

Algumas estruturas do tronco encefálico, como por exemplo: RVM e SCPvl, podem mediar tanto a inibição quanto facilitação da dor. Nesse contexto, a intensidade do estímulo determina se é produzida inibição ou facilitação rostrocaudal da dor, pois, estímulos elétricos de baixa intensidade produziram facilitação, enquanto estímulos de maior intensidade produziram inibição da resposta nociceotiva nessas estruturas (ZHUO e GEBHART, 1991). Além disso, a injeção de pequenas quantidades de glutamato ou agonista opióide, em áreas do tronco encefálico, como RVM e SCPvl, provocaram facilitação da resposta nociceptiva (URBAN e GEBHART 1999; HOLDEN e PROUDFIT, 1999).

MARTINS et al. (2010) observaram que a injeção de glicina na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), cinco minutos antes da administração de formalina na articulação do joelho de ratos, causou hipernocicepção nas doses de 10 e 20 mmol e antinocicepção nas doses de 80 e 100 mmol.

O RVM também possui um importante papel na facilitação da resposta nociceptiva. A modulação da dor no RVM depende de, pelo menos, três tipos de neurónios, são eles: as células ON, OFF e neutras. As células ON aumentam sua atividade antes de comportamentos nociceptivos de animais, enquanto as células OFF pausam abruptamente. Por outro lado, a ativação das células OFF resulta na inibição da entrada nociceptiva. As células neutras respondem a alguns estímulos nocivos e a outros não, esses neurônios podem representar um subtipo de células ON ou OFF (FIELDS et al. 1983).

Ainda neste sentido, FIELDS et al. (1983) observaram que a morfina ativa tonicamente as células OFF e inibe as células ON. Por outro lado, HEINRICHER et al. (1992) mostraram que a morfina inibe diretamente as células ON, que possuem receptores opióides do tipo μ, mas que não ativa diretamente as células OFF, sendo estas ativas pela inibição do interneurônio gabarérgico que está tonicamente ativo. Em geral, os estudos com animais envolvendo a hiperalgesia parecem aumentar a atividade das células ON, enquanto que as manipulações hipoalgésicas ou analgésicos levam ao aumento da atividade das células OFF. Contudo, estes levantamentos sugerem que SCP e RVM desempenham um papel importante, não apenas para a antinocicepção, mas também no desenvolvimento e na manutenção da resposta nociceptiva.

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do comportamento do gato nas respostas defensivas e nociceptivas de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do comportamento do gato e da possibilidade de fuga nas respostas comportamentais defensivas de ratos;
- Avaliar o efeito do comportamento do gato e da possibilidade de fuga na resposta nociceptiva de ratos;
- Avaliar as respostas comportamentais defensivas de ratos reexpostos ao contexto aversivo;
- Verificar a resposta nociceptiva mediada pela reexposição ao contexto aversivo.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados 48 ratos Wistar, com peso que variou de 250 a 350 gramas, provenientes do biotério do Laboratório de Fisiologia do Comportamento da UFS. Os animais foram mantidos em gaiolas com no máximo cinco animais, com livre acesso à água e comida, no biotério do Laboratório de Fisiologia do Comportamento da UFS, com temperatura controlada entre 22 e 24ºC e ciclo claro/escuro de 12h. Além disso, foram utilizados gatos machos adultos de proprietário particular, os quais permaneceram na universidade apenas durante os testes comportamentais. Todos os protocolos experimentais foram conduzidos em acordo com os princípios éticos estabelecidos pelas Resoluções Normativas, Decretos e Portarias do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), bem como a Lei Nº 11.794 (Lei Arouca). Os experimentos foram iniciados após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFS, sob protocolo Nº. 49/2015.

4.2 APARATO PARA O TESTE COMPORTAMENTAL

O aparato para o teste comportamental consistiu em uma arena retangular (80 cm x 22 cm x 50 cm) de mdf, dividida em dois compartimentos iguais de 40 cm por uma parede de acrílico com pequenos furos que permitem o rato ver e sentir o cheiro do gxzato. Durante a sessão experimental, o rato foi colocado no compartimento oposto ao gato. O compartimento onde se encontrava o rato ainda foi dividido em duas partes iguais (20 cm cada) por uma parede com um orifício, que permitiu a movimentação do rato nas duas partes do compartimento. Em alguns grupos experimentais, essa parede foi substituída por outra parede sem o orifício, que impedia a entrada do rato no abrigo. A parte próxima ao gato foi considerada a área de confronto e a parte distante, o abrigo.
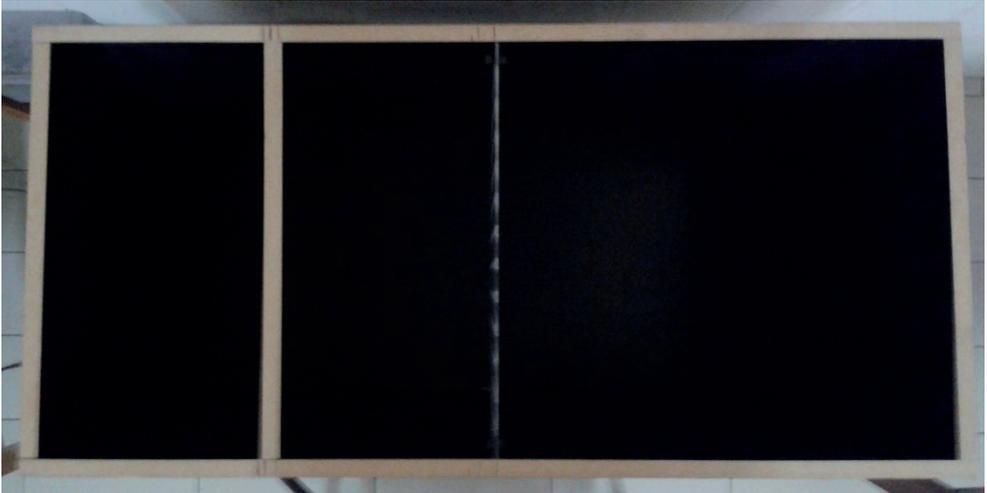
Figura 1: Aparato para o teste comportamental

Fonte: arquivo pessoal.

4.3 TESTE COMPORTAMENTAL

Para o teste comportamental, os animais foram expostos a um gato apresentando comportamento mais ativo (GAt) ou inativo (GIn). Como o nosso objetivo foi verificar variações na resposta comportamental e nociceptiva dos ratos a partir do comportamento do gato e a maioria dos gatos testados não mostravam interesse nos ratos, decidimos colocar junto com o GAt a gravação de um miado. Assim, antes da sessão experimental, todos os ratos foram previamente habituados durante 5 minutos por 2 dias consecutivos, na arena de teste. No terceiro dia (D1), os ratos foram expostos ao aparato vazio (CTRL), GAt ou GIn, por 5 min. Finalmente no quarto dia (Dia experimental 2 - D2), o rato retornou à arena de teste por 5 min, sem a presença do gato. Todas as sessões experimentais foram filmadas para posterior análise comportamental. Após cada sessão experimental, a arena de testes foi cuidadosamente limpa com uma solução de etanol a 10%.
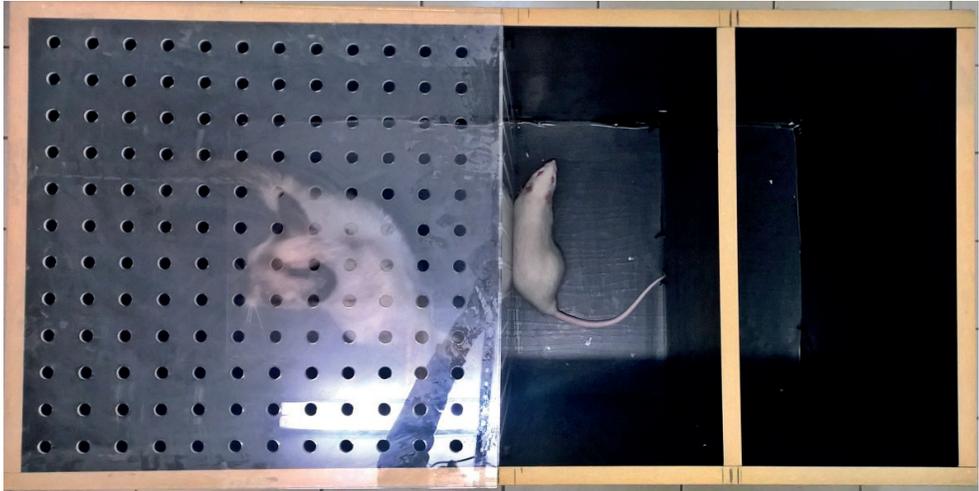
Figura 2: Rato Wistar durante a realização do teste comportamental com a presença do gato.

Fonte: arquivo pessoal.

4.4 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Os vídeos gravados durante as sessões experimentais foram avaliados posteriormente por um observador treinado. Os seguintes comportamentos foram individualmente considerados: congelamento (cessação de todos os movimentos) e atividade exploratória: quantidade de quadrantes cruzados, "*rearing*" (comportamento de levantar sobre as patas traseiras) e avaliação de risco (as tentativas de aproximação da área próxima ao gato, colocando o nariz ou patas dianteiras no espaço novo e retornando imediatamente ao abrigo).

4.5 TESTE ALGESIMÉTRICO DA PLACA QUENTE

Para a realização do teste da placa quente (PQ), os animais foram colocados sobre uma placa de alumínio mantida a 52 ± 1°C, com caixa de acrílico transparente para contenção do animal. Os animais permaneceram sobre o aparato até a emissão da resposta comportamental sugestiva de dor, e o tempo decorrido até a emissão dessa resposta foi cronometrado. A resposta considerada foi a lambedura de uma das patas traseiras ou salto. Caso o animal não apresentasse a resposta comportamental no período de 30 segundos (tempo de corte), o mesmo era retirado da placa para se evitar possíveis danos teciduais.

Para realização desses experimentos, todos os ratos foram previamente adaptados às condições experimentais. Para tanto, os animais foram colocados sobre a placa quente, mantida a temperatura ambiente, por 5 minutos durante dois dias consecutivos. No dia do experimento, foi determinada a latência basal da resposta emitida pelo animal quando colocado sobre a placa quente a 52°C. A latência basal é a média de três medidas

efetuadas em intervalos aleatórios de 3 a 5 minutos entre eles, para cada animal. Após a determinação da latência basal, os animais foram submetidos às condições experimentais e foram testados novamente na PQ, nos intervalos de tempo de 0, 15, 30 e 60 minutos.
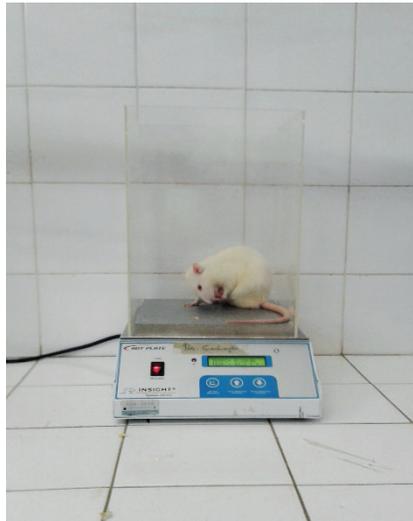
Figura 3: Rato Wistar na placa quente durante a realização do teste algesimétrico

Fonte: arquivo pessoal.

4.6 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os ratos dos grupos CTRL, GAt e GIn (N= 8 por grupo) foram colocados na arena teste por 5 minutos com ou sem a opção de fuga para o abrigo e, após a sessão comportamental, as respostas nociceptivas foram avaliadas nos intervalos de tempo de 0, 15, 30, e 60 minutos. No dia seguinte, os ratos retornaram à arena de teste por 5 min, sem a presença do gato. Ao término do teste comportamental, as respostas nociceptivas foram avaliadas nos intervalos de tempo de 0, 15, 30, e 60 minutos.
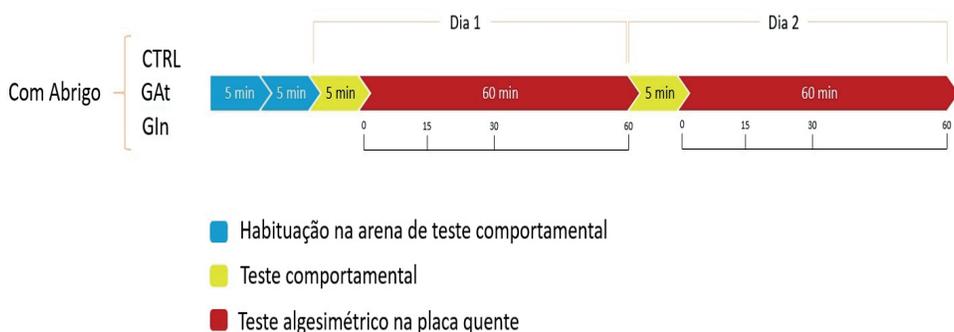
Figura 4: Representação esquemática das etapas realizadas com os grupos experimentais que tiveram a opção do abrigo (COM ABRIGO) na arena de teste comportamental.
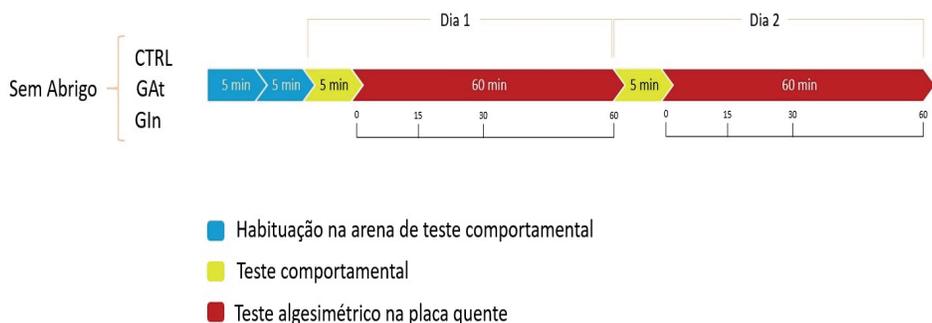
Figura 4: Representação esquemática das etapas realizadas com os grupos experimentais que não tiveram a opção do abrigo (SEM ABRIGO) na arena de teste comportamental.

4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados obtidos do teste comportamental foram analisados por ANOVA de duas vias para medidas independentes [fator 1: comportamento do gato (CTRL, GAt ou GIn); fator 2: possibilidade de fuga (SEM ABRIGO, COM ABRIGO)]. No caso de interação significativa entre o fator 1 e o fator 2, foi conduzido um teste a posteriori de Tukey para a interação. Na ausência de interação significativa, os fatores individuais foram analisados de forma independente por meio de uma ANOVA de uma via e o teste a posteriori de Tukey foi realizado, quando apropriado.

Os dados obtidos na placa quente foram analisados por meio de ANOVA de três vias para medidas repetidas [fator 1: comportamento do gato (CTRL, GAt ou GIn); fator 2: possibilidade de fuga (SEM ABRIGO, COM ABRIGO); fator 3: intervalo de tempo (0, 15, 30 e 60 min)]. Como não houve a interação significativa dos três fatores, foi analisada a interação significativa observada entre os fatores: comportamento do gato e intervalo de

tempo. As análises seguiram-se com a fixação do fator comportamento do gato para a realização de ANOVA de uma via para medidas repetidas no fator intervalo de tempo e teste a posteriori de Tukey, quando apropriado.

Os testes estatísticos foram feitos por meio do software Statistic for Windows. Todos os testes foram bicaudais e com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

5.1 EFEITO DO COMPORTAMENTO DO GATO E DA POSSIBILIDADE DE FUGA NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS DEFENSIVAS DE RATOS

5.1.1 Tempo de Congelamento (TC)

5.1.1.1 Dia 1

Não houve interação significativa dos fatores comportamento do gato e possibilidade de fuga ($F_{2,43}$= 1,28; p= 0,28); portanto, os dois fatores foram analisados individualmente. A aplicação do ANOVA mostrou haver diferença significativa no tempo de congelamento quando analisado o fator comportamento do gato ($F_{2,43=}$ 42,58; p < 0,01). Assim, os grupos GAt (p < 0,01) e GIn (p= 0,03) apresentaram um tempo de congelamento significativamente maior que o CTRL (Figura 6). Além disso, o grupo GAt teve um tempo de congelamento maior que o grupo GIn (p< 0,01). O efeito da possibilidade de fuga não mostrou diferença significativa ($F_{1,43}$= 1,61; p = 0,21).
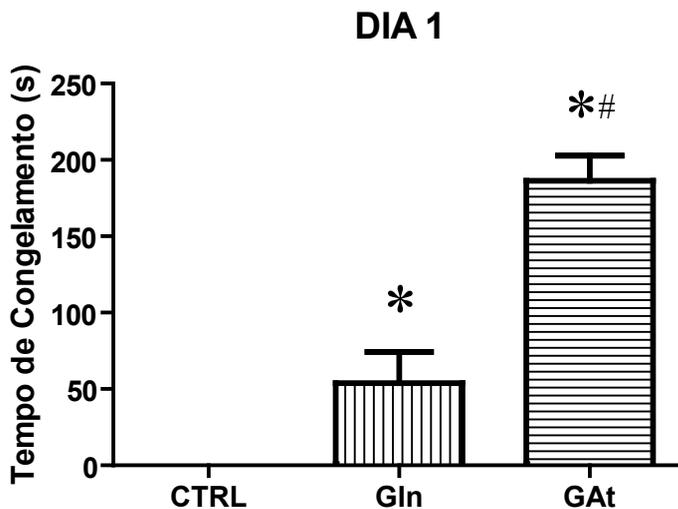
Figura 6: Tempo de congelamento, em segundos, dos grupos CTRL, GIn e GAt (N= 16 por grupo). Dados são expressos como Média ± EPM. **p*<0,05 quando comparados com o grupo CTRL. # p<0,05 quando comparado com o grupo GIn (pós-teste de Tukey).

5.1.1.2 Dia 2

Não houve interação significativa dos fatores comportamento do gato e possibilidade de fuga ($F_{2,43}$= 0,03; p= 0,96); portanto, os dois fatores foram analisados individualmente. A aplicação do ANOVA mostrou haver diferença significativa no tempo de congelamento quando analisado o fator comportamento do gato ($F_{2,43}$=3,93 p= 0,02). Assim, o grupo GAt (p= 0,04) apresentou um tempo de congelamento significativamente maior que os grupos CTRL e GIn (Figura 7). O efeito da possibilidade de fuga não foi significativamente diferente ($F_{1,43}$= 0,14; p= 0,70).
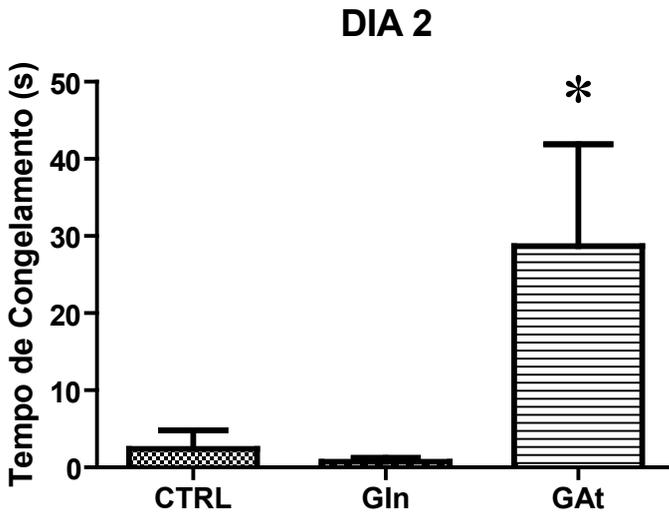
Figura 7: Tempo de congelamento, em segundos, dos grupos CTRL, GIn e GAt no dia 2 (N= 16 por grupo). Dados são expressos como Média ± EPM. *p<0,05 quando comparados os grupos CTRL e GIn. (pós-teste de Tukey).

5.1.2 Tempo de *Rearing* (TR)

5.1.2.1 Dia 1

Não houve interação significativa dos fatores comportamento do gato e possibilidade de fuga ($F_{2,43}$= 2,10; p= 0,13); portanto, os dois fatores foram analisados individualmente. A aplicação do ANOVA mostrou haver diferença significativa no tempo de *rearing* quando analisado o fator comportamento do gato ($F_{2,43=}$ 11,58; p< 0,001). Assim, os grupos GAt (p< 0,01) e GIn (p= 0,02) apresentaram um tempo de *rearing* significativamente menor que o CTRL (Figura 8). O efeito da possibilidade de fuga não foi significativo ($F_{1,43}$< 0,01; p= 0,99).
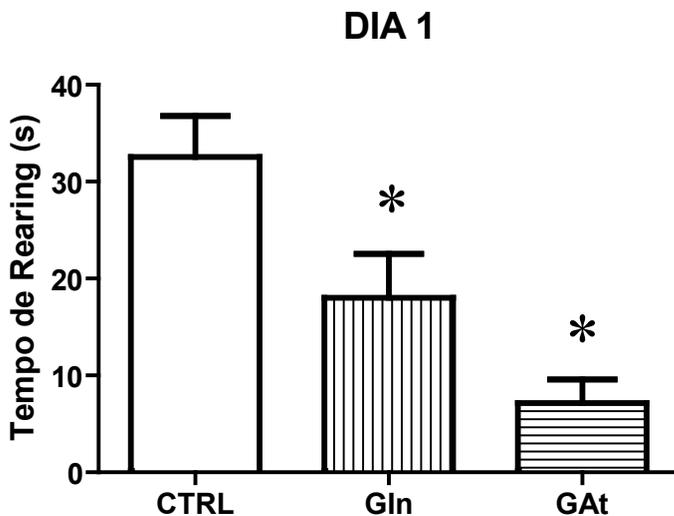
Figura 8: Tempo de *rearing*, em segundos, dos grupos CTRL, GIn e GAt (N= 16 por grupo). Dados são expressos como Média ± EPM. *p<0,05 quando comparados com o grupo CTRL. (pós-teste de Tukey).

5.1.2.2 Dia 2

Houve interação significativa dos fatores comportamento do gato e possibilidade de fuga ($F_{2,43}$= 3,61; p= 0,03). Assim, os animais do grupo GIn sem a possibilidade de fuga apresentaram um maior tempo de *rearing* do que os animais do grupo CTRL (p= 0,01) com a possibilidade de fuga (Figura 9).
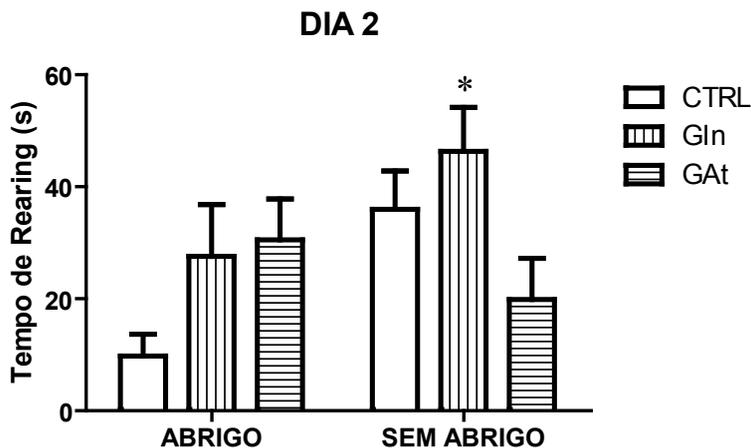
Figura 9: Tempo de *rearing*, em segundos, dos grupos CTRL, GIn e GAt, com ou sem a possibilidade de fuga para o abrigo no dia 2 (N= 8 por grupo). Dados são expressos como Média ± EPM. *p<0,05 foi diferente do CTRL quando comparado os fatores comportamento do gato e possibilidade de fuga (Anova de duas vias para medidas independentes).

5.1.3 Quantidade de quadrantes cruzados (QC)

5.1.3.1 Dia 1

Não houve interação significativa dos fatores comportamento do gato e possibilidade de fuga ($F_{2,43}$= 2,50; p= 0,09); portanto, os dois fatores foram analisados individualmente. A aplicação do ANOVA mostrou haver diferença significativa na Quantidade de quadrantes cruzados quando analisado o fator comportamento do gato ($F_{2,43=}$ 16,00; p= 0,00). Assim, os grupos GAt (p< 0,001) e GIn (p= 0,01) apresentaram uma quantidade de quadrantes cruzados significativamente menor que o CTRL, bem como, o grupo GAt (p= 0,04) apresentou número de cruzamentos nos quadrantes menor que o GIn (Figura 10). O efeito da possibilidade de fuga foi significativo ($F_{1,43}$= 10,80; p< 0,00), porém é irrelevante para os resultados, considerando que os grupos que não têm a possibilidade de fuga possuem menos quadrantes para cruzar.
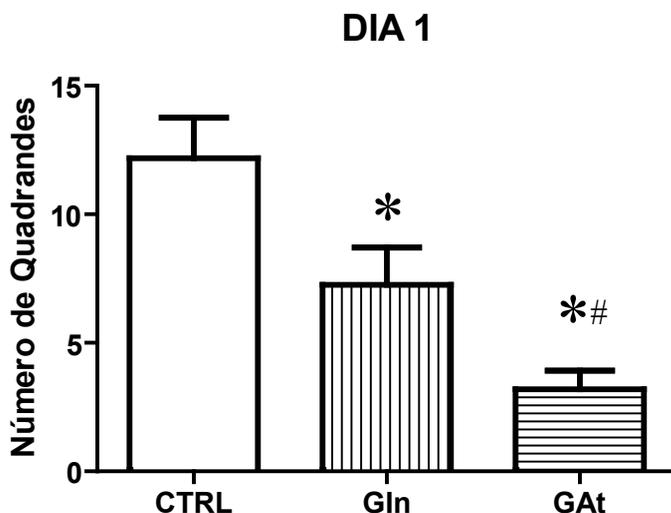
Figura 10: Quantidade de quadrantes cruzados dos grupos CTRL, GIn e GAt (N= 16 por grupo). Dados são expressos como Média ± EPM. **p*<0,05 quando comparados o grupo CTRL. # *p*<0,05 quando comparado com o grupo GIn (pós-teste de Tukey).

5.1.3.2 Dia 2

Houve interação significativa dos fatores comportamento do gato e possibilidade de fuga ($F_{2,43}$= 4,00; p= 0,02). Assim, o grupo GIn sem a possibilidade de fuga apresentou uma maior quantidade de quadrantes cruzados que os grupos CTRL (p= 0,02) sem a possibilidade de fuga e GAt (p< 0,01) sem a possibilidade de fuga (Figura 11).
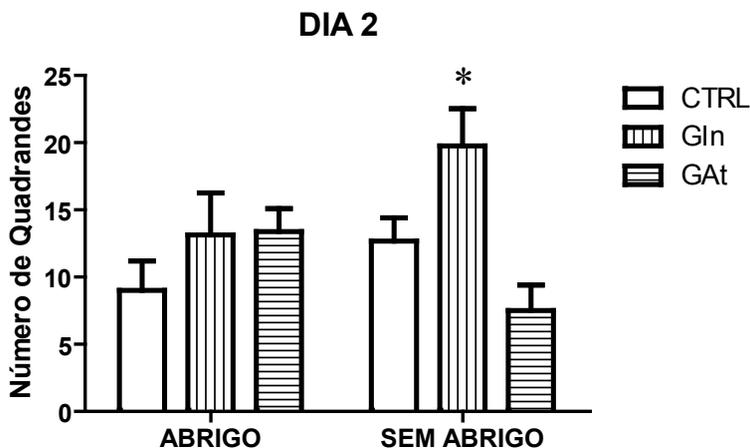
Figura 11: Quantidade de quadrantes cruzados dos grupos CTRL, Gln e GAt, com ou sem a possibilidade de fuga para o abrigo no dia 2 (N= 8 por grupo). Dados são expressos como Média ± EPM. *p<0,05 quando comparado os fatores comportamento do gato e possibilidade de fuga (Anova de duas vias para medidas independentes).

5.1.4 Número de tentativas ou avaliação de risco (AR)

5.1.4.1 Dia 1

Não houve interação significativa dos fatores comportamento do gato e possibilidade de fuga ($F_{2,43}$= 1,51; p= 0,23); portanto, os dois fatores foram analisados individualmente. A aplicação do ANOVA mostrou haver diferença significativa no número de tentativas ou avaliação de risco quando analisado o fator possibilidade de fuga ($F_{1,43}$= 1,51; p= 0,23). Contudo, tal diferença se deve ao fato dos animais do grupo sem abrigo não terem a possibilidade de exibir respostas de avaliação de risco, pois, a mesma se refere às tentativas de aproximação da área mais próxima ao gato quando o rato se encontrar no abrigo.

5.1.4.2 Dia 2

Não houve interação significativa dos fatores comportamento do gato e possibilidade de fuga ($F_{2,43}$= 0,82; P= 0,44); portanto, os dois fatores foram analisados individualmente. A aplicação do ANOVA mostrou haver diferença significativa no número de tentativas ou avaliação de risco quando analisado o fator comportamento do gato ($F_{2,43=}$ 4,21; p= 0,02). Assim, o grupo GIn (p= 0,01) mostrou um número de tentativas ou avaliação de risco significativamente maior que o CTRL (Figura 12).
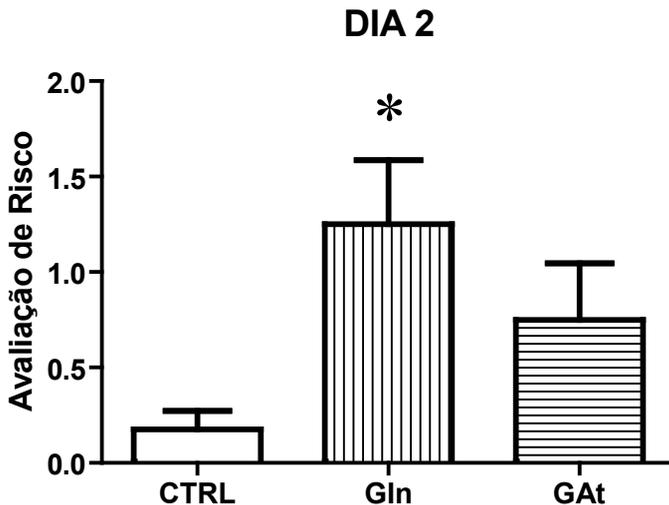
Figura 12: Número de tentativas ou avaliação de risco dos grupos CTRL, GIn e GAt no dia 2 (N= 16 por grupo). Dados são expressos como Média ± EPM. *p<0,05 quando comparado com o grupo CTRL (pós-teste de Tukey).

5.2 EFEITO DO COMPORTAMENTO DO GATO E DA POSSIBILIDADE DE FUGA NAS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS DE RATOS

5.2.1 Dia 1

A aplicação da ANOVA de três vias para medidas repetidas não mostrou interação significativa dos fatores comportamento do gato, possibilidade de fuga e intervalo de tempo ($F_{8,168=}$ 1,22; p= 0,32). Contudo, após a fixação do fator possibilidade de fuga, a aplicação do ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostrou haver interação significativa entre os fatores comportamento do gato e intervalo de tempo ($F_{8,168=}$ 3,60; p= 0,01). Fixando-se o fator comportamento do gato, o intervalo de tempo como fator único mostrou que o grupo GAt apresentou resultado significativo ($F_{4,60=}$ 4,53; p< 0,01), sendo observada uma resposta antinociceptiva no tempo 0, onde foi significativamente diferente do basal (p< 0,01) e do intervalo de tempo 60 (p= 0,01). (Figura 13)
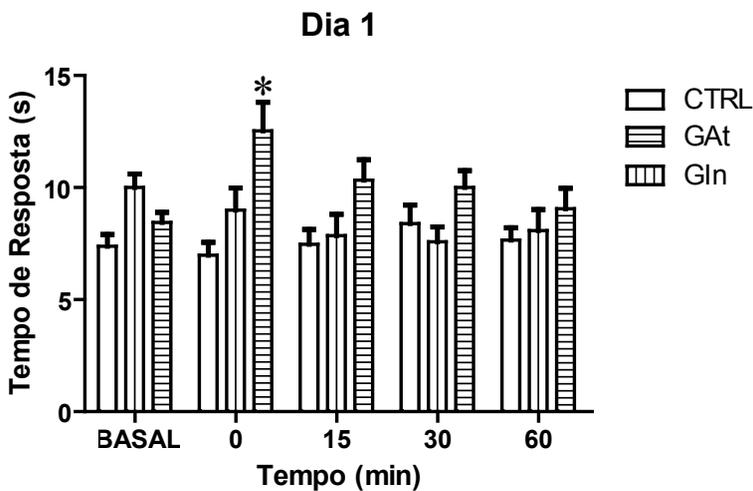
Figura 13: Tempo de resposta nociceptiva, em segundos, dos grupos CTRL, Gln e GAt (N= 16 por grupo). Dados são expressos como Média ± EPM. *p<0,05, quando comparado com o BASAL e aos 60 min (Anova de três vias para medidas repetidas).

5.2.2 Dia 2

Não houve interação significativa dos fatores comportamento do gato, possibilidade de fuga e intervalo de tempo ($F_{8,168=}$ 0,40; p= 0,12). Nenhuma interação foi observada entre os fatores comportamento do gato e intervalo de tempo ($F_{8,168}$= 1,48; p= 0,09) e possibilidade de fuga e intervalo de tempo ($F_{4,168=}$ 0,52; p= 0,24).

DISCUSSÃO

No presente estudo, verificamos as respostas comportamentais e nociceptivas de ratos frente a estímulos aversivos de diferente intensidade. Os resultados mostraram que a exposição a gatos ativos causou congelamento associado à redução da sensibilidade nociceptiva, enquanto que gatos inativos causaram respostas de congelamento sem alterar a resposta nociceptiva. No dia 2, a reexposição ao contexto aversivo causou congelamento sem alterar a resposta nociceptiva nos ratos que foram expostos ao gato ativo no dia anterior e comportamento de avaliação de risco sem alterar a resposta nociceptiva nos ratos que foram expostos ao gato inativo no dia anterior. Esse conjunto de dados sugere que os ratos apresentam comportamentos distintos dependendo do comportamento do gato durante um confronto. Além disso, a forma como aconteceu o contato com o gato determinará a resposta dos ratos na reexposição.

Assim, os resultados do presente estudo mostraram que no dia 1, houve um aumento no tempo de congelamento dos ratos expostos ao gato, quando comparados com os que foram expostos apenas à caixa vazia; e que os ratos expostos ao gato com comportamento ativo (GAt) apresentaram um maior tempo de congelamento que os ratos expostos ao gato com comportamento inativo (GIn). Isso nos mostra que o comportamento do gato influência diretamente a resposta defensiva de congelamento dos ratos. De acordo com BLANCHARD e BLANCHARD (1988), o congelamento é uma resposta defensiva, onde o animal permanece imóvel caso a fuga não seja viável e/ou o predador mantenha ainda certa distância. Contudo, nossos dados mostram que a possibilidade ou não de fuga não influenciou nas respostas de congelamento.

Em um estudo que corrobora nossos achados, BLANCHARD et al. (1990) observaram que em um sistema de tocas que tinha muitas características do habitat natural de ratos, os ratos fugiam para as tocas e apresentavam comportamento de congelamento dentro das tocas, após serem confrontados com seu predador natural (gato) fora das tocas. Além disso, trabalhos mostram que a exposição de ratos a diversos tipos de estímulos aversivos, evoca respostas de congelamento. Por exemplo, TAUGHER et al. (2015) constataram que ratos exibem resposta de congelamento, quando são expostos em uma câmara a um lenço de papel contendo 6 ml de trimethylthiazoline (TMT), um odor isolado de fezes da raposa. Já HEGAB et al. (2013) observaram que ratos apresentaram respostas de congelamento, quando foram expostos a fezes de gato recém-colhidas. Adicionalmente, em um estudo recente, camundongos foram expostos a vários tipos de estímulos aversivos (rato predatório, co-específico agressivo, choque no pé ou rato de brinquedo) em duas câmaras separadas por um corredor estreito (SILVA et al. 2013). Neste estudo, todos os estímulos aversivos provocaram respostas de congelamento nos ratos e, apenas a exposição ao rato de brinquedo não evocou congelamento nos ratos. Tais estudos comprovam a existência da resposta de congelamento em ratos, quando estes são expostos a diversos tipos de

estímulos aversivos. No presente estudo, verificamos que os ratos são capazes de avaliar o grau de ameaça oferecido em cada situação e apresentar comportamentos defensivos de intensidades diferentes, associados ou não a antinocicepção, compatíveis com o grau da ameaça, como o congelamento. Nesse contexto, a presença de um gato mais ativo produziu congelamentos de duração maior comparados ao gato inativo.

A avaliação da atividade exploratória dos ratos no teste comportamental, no dia 1, foi possível através das medidas do tempo de rearing (TR), quantidade de quadrantes cruzados (QC) e número de tentativas ou avaliação de risco (AV). A atividade exploratória pode ser usada como índice de ansiedade, uma vez que uma maior atividade exploratória do rato sugere menor a ansiedade (LISTER, 1990). No presente estudo, foi observado que os ratos que foram expostos ao GAt ou GIn apresentaram menores TR e QC que o grupo CTRL, confirmando assim, uma diminuição na atividade exploratória dos ratos quando expostos ao seu predador natural e possível maior ansiedade. Ainda neste sentido, a influência do comportamento do gato na atividade exploratória de ratos pode ser observada no menor QC nos ratos expostos ao GAt. Além disso, os dados de TR e QC no Dia 1 do presente estudo podem ser considerados complementares ao comportamento de congelamento observado, uma vez que o mesmo é caracterizado pela inibição dos movimentos, o que interfere diretamente nas respostas de rearing e exploratória. Assim, como no Dia 1 do nosso estudo, o gato estava presente durante o teste comportamental, consequentemente, podemos acreditar que as reduções de TR e QC estão associadas ao medo e ao comportamento de congelamento associado a tal animal.

O dia 2 de teste comportamental teve como objetivo verificar se a reexposição dos ratos ao contexto aversivo induziria respostas defensivas e/ou alterações na sensibilidade dolorosa associada a esta situação. Nossos resultados mostraram que o medo, ao contexto aversivo, pôde ser visto nos ratos expostos ao gato ativo, pois, estes apresentaram maior resposta de congelamento no dia 2 que os ratos expostos ao gato inativo. Os resultados da atividade exploratória mostraram que no dia 2, os ratos que foram expostos ao gato com comportamento inativo apresentaram maior número de respostas de avaliação de risco, caracterizando maior ansiedade. Em contrapartida, estes exploraram mais o ambiente, sendo observado um maior tempo de *rearing* e maior número de quadrantes cruzados quando comparado com o CTRL. Provavelmente, essa maior atividade exploratória possa estar associada a uma reavaliação do ambiente após uma situação de confronto aversivo. Diante disso, os ratos do grupo CTRL exploraram menos, já que, considerando a habituação, o dia 2 representa o quarto dia seguido de exposição a arena de teste comportamental sem alteração nas condições experimentais. O estudo de SILVA et al. (2013) corrobora em parte os nossos achados. Eles expuseram camundongos a diversos estímulos aversivos, tais como: rato predatório, co-específico agressivo, choque no pé ou rato de brinquedo. No dia seguinte, a reexposição ao contexto aversivo provocou o aumento das respostas defensivas de congelamento, fuga, posição de estiramento e uma diminuição na locomoção. Por sua

vez, VIELLARD et al. (2016) desenvolveram um estudo com ratos, onde foram observadas respostas de medo contextual, baseada em choque, usando diferentes condições de teste comportamental. Eles viram que as respostas de medo ao contexto variavam de acordo com as condições ambientais do teste. De modo que os animais que foram limitados a acessar apenas a câmara de condicionamento, no dia posterior ao recebimento de choques no pé apresentaram respostas de medo contextual, caracterizadas pelo congelamento. Enquanto isso, os que tiveram acesso a outro compartimento, sem a presença do estímulo aversivo, exibiram comportamento de avaliação de risco. Estes resultados apoiam os nossos achados, pois eles apontam para a existência de medo ao contexto aversivo. Em contrapartida, nosso estudo mostrou que esse medo depende da intensidade do estímulo, neste caso, o comportamento do predador (GAt ou GIn) e não depende das condições ambientais usadas no teste comportamental. De acordo com BLANCHARD et al. (1990), o medo surge diante de situações claras e evidentes de ameaça e perigo real ou aparente. Já a ansiedade é desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, incerto e vago, neste caso, o rato exposto ao gato, com comportamento ativo, encara a reexposição à arena como uma situação de perigo real (medo ao contexto). Por outro lado, o GIn avalia a reexposição como uma situação de perigo incerto (ansiedade). Tal hipótese se baseia no fato dos animais do grupo GAt apresentarem maior congelamento durante a reexposição, enquanto que os do grupo GIn respondem com respostas de avaliação de risco a reexposição.

No teste algesimétrico da placa quente, nossos resultados mostraram que apenas os ratos que foram expostos ao gato ativo (GAt) apresentaram antinocicepção. Este resultado confirma a nossa hipótese de que o comportamento do predador (gato) influencia diretamente às respostas nociceptivas de ratos, porém, as características do ambiente (possibilidade ou não de fuga) não influenciam. De acordo com RODGERS e RANDALL (1987), o congelamento é uma resposta defensiva do tipo passiva e está associado à analgesia causada por opióides endógenos, que seria uma analgesia mais duradoura (mais ou menos 40 minutos). Entretanto, nossos resultados mostraram que os ratos que foram expostos ao gato ativo apresentaram o maior tempo de congelamento e foram os únicos que apresentaram resposta antinociceptiva. Tal resposta esteve presente apenas no tempo 0, logo após o fim do teste comportamental, sendo que, nos tempos 15, 30 e 60 minutos, a resposta não existiu. Seguindo a teoria de RODGERS e RANDALL (1987), as respostas antinociceptivas mais rápidas (mais ou menos 10 minutos) estariam associadas a comportamentos defensivos ativos, como fuga ou luta, e a analgesia seria mediada por substâncias endógenas não-opióides. Na reexposição, não foi observada resposta antinociceptiva no teste algesimétrico, apesar da existência do medo ao contexto aversivo e congelamento nos ratos que foram expostos ao GAt. Estas respostas não foram tão intensas como no dia 1. Uma vez que estímulos aversivos podem iniciar respostas antinociceptivas opióides ou não-opióides, estudos futuros são necessários para avaliar o tipo de analgesia mediada em nosso modelo.

Apesar da ocorrência de comportamentos defensivos, os animais expostos ao gato inativo apresentaram ausência da resposta antinociceptiva, a qual pode ter sido consequência da linhagem de ratos utilizada para o experimento, do tempo de exposição ao gato ou contexto aversivo e, ainda, do teste algesimétrico utilizado. Neste sentido, estudos com linhagens de ratos e tempos de exposição diferentes mostram resultados que divergem dos nossos achados, por exemplo, KAVALIERS (1988) observou que a exposição de ratos (*Peromyscus leucopus*), por 30 s, 5 e 15 min a um predador natural (*Mustela erminea*), resultou em respostas antinociceptivas. Já LICHTMAN e FANSELOW (1990) mostraram que, após 2 min de exposição a um gato, ratos apresentaram antinocicepção em dois tipos de testes de retirada da cauda (estímulo térmico ou choque). Além disso, outra explicação para a ausência de antinocicepção na reexposição é a redução na intensidade do estímulo devido à ausência do gato.

Sabe-se que, o medo e a ansiedade evocam comportamentos defensivos e estes, por sua vez, modulam respostas nociceptivas. Muitos trabalhos mostraram que diversas estruturas são ativadas em roedores, quando estes são expostos a diversos tipos de estímulos aversivos, como: odor predatório, predador natural, fezes do predador natural, co-específico agressivo, gato de brinquedo e choque ao pé. Tais estruturas são porção anteromedial do núcleo leito da estria terminal, amígdala medial, núcleo periventricular parvocelular, núcleo pré-mamilar dorsal e lateral, núcleo dorsal da rafe, amígdala medial póstero ventral, núcleos hipotalâmicos (dorsomedial do hipotálamo ventromedial - VMHdm, ventrolateral do hipotálamo ventromedial - VMHvl), (BEIJAMINI e GUIMARÃES, 2006; COMOLI et al., 2003; DIELENBERG et al. 2001; SILVA et al. 2013; VIELLARD et al. 2016). Porém, a região que mais parece modular, concomitantemente, respostas comportamentais defensivas e nociceptivas é a substância cinzenta periaquedutal (SCP). A SCP está dividida em áreas, tais como: SCP dorsolateral, SCP dorsomedial, regiões dorsomedial e dorsolateral da SCP rostral e nas regiões lateral e ventrolateral da SCP caudal. Estas áreas estão envolvidas diretamente em respostas defensivas frente a estímulos predatórios (CANTERAS e GOTO, 1999; BEIJAMINI e GUIMARÃES, 2006; COMOLI et al. 2003; DIELENBERG et al. 2001). Além disso, a SCP também participa da modulação da resposta nociceptiva juntamente com outras estruturas do tronco encefálico, como o bulbo rostral-ventro-medial (RVM) e Locus Coeruleus (LC) (YAKSH, 1984; YAKSH, 1978; JONES 1988; GEBHART, 1986; GEBHART, 1988). Nossos resultados mostraram que os ratos expostos ao GAt apresentaram maior tempo de congelamento e foram os únicos que mostraram resposta antinociceptiva. Assim, é provável que o medo e o estresse causado ativaram áreas do sistema límbico, tais como: amigdala e hipotálamo, que ativaram a SCP (JONES, 1991; BOWKER, 1988; MINSON et al., 1991; BOWKER et al., 1983; HUNT; MANTHY, 2002). Seguindo a teoria de RODGERS e RANDALL (1987), a analgesia de curta duração em respostas defensivas estaria associada a liberação endógena de noradrenalina, assim a antinocicepção de curta duração observada no presente estudo, provavelmente

foi causada pela ativação da SCP. Esta emite projeções para outras estruturas do tronco encefálico, tais como: tegumento pontino dorsolateral e locus coeruleos, que, por sua vez, são responsáveis pela analgesia noradrenérgica no corno dorsal da medula espinhal (JONES, 1992; PROUDFIT, 1988; PROUDFIT 1991; CLARK, 1991; GEBHART, 1986). Assim, é possível explicar o fato da antinocicepção observada nos ratos expostos ao gato ativo, embora estudos futuros sejam necessários para confirmar tal hipótese.

Nossos resultados mostram que, no nosso aparato experimental, a possibilidade ou não de fuga para o abrigo não influenciou nas respostas defensivas (congelamento) e nociceptivas. Isso pode ter acontecido devido a alguma limitação metodológica, como por exemplo, a proximidade entre o rato e o gato mesmo depois do rato fugir para o abrigo. Assim, a presença do abrigo não representou uma redução do caráter aversivo do confronto. Nesse contexto, alguns ajustes podem ser feitos no aparato experimental para que a fuga para o abrigo represente uma redução na intensidade do estimulo aversivo da situação experimental. Possivelmente, um aumento na distância entre o abrigo e o gato proporcionasse uma condição de segurança maior para o rato, modificando sua interpretação do contexto aversivo a que foi inserido.

Os resultados encontrados no presente estudo mostram de forma interessante que a resposta defensiva e a antinocicepção apresentadas pelo rato depende do comportamento do gato. Além disso, dependendo do grau de ameaça apresentado, os animais apresentam respostas comportamentais sugestivas de medo ou ansiedade durante a reexposição ao contexto. Com base nesses resultados, estudos futuros podem nos ajudar a elucidar os mecanismos centrais envolvidos na seleção dos comportamentos defensivos durante uma situação de confronto com o predador. Na reexposição, os nossos achados nos permitem estudar a relação entre o comportamento do gato no confronto, as estruturas centrais envolvidas com a memória aversiva e o tipo de comportamento apresentado pelo rato.

CONCLUSÃO

Com base nos nossos achados, é possível concluir que o comportamento ativo do gato aumenta o tempo de congelamento, diminui a atividade exploratória, induz respostas antinoceptivas em ratos e provoca respostas de congelamento na reexposição dos ratos ao contexto aversivo. Por outro lado, comportamentos menos ativos do gato são capazes de induzir congelamento dissociado de analgesia em ratos e, durante a reexposição, os animais apresentam comportamentos de avaliação de risco. Contudo, as características ambientais (possibilidade de fuga ou não para o abrigo) do presente estudo não foram capazes de influenciar nas respostas nociceptivas e comportamentais defensivas de ratos.

REFERÊNCIAS

ADAMEC, R.E.; SHALLOW, T. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. **Physiology & Behavior**, Vol. 54, p. 101-109, 1993.

AIRMONE, L.D. et al. Stimulation-produced spinal inhibition from the midbrain in the rat is mediated by an excitatory amino acid neurotransmitter in the medial medula. **J. Neurosci**, v.6, p. 1803-1813, 1986.

AMANO, K. et al. Single neuron analysis of the human mid brain tegmentum (rostral mesencephalicreticulotomy for pain relief). **Appl. Neurophysiol**, v.41, p.66-78, 1978.

ANTONIADIS, E.A.; MCDONALD, R.J. Amygdala, hippocampus and discriminative fear conditioning to context. **Behav Brain Res**, v.108, p.1-19, 2000.

BAJIC, D.; PROUDFIT, H.K. Projections of neurons in the periaquedutal gray to pontine and medullary catecholamine cell group involved in the modulation of nociception. **J. Comp. Neurol**, v.405, p.359-379, 1999.

BECKETTE, S.; MARSDEN, C.A. Computer analysis and quantification of periaqueductal grey-induced defence behaviour. **J Neurosci Methods**, v.58, p.157-161, 1995.

BEIJAMINI, V.; GUIMARAES. F.S. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. **Behav Brain Res**, v.170, p.52-61, 2006.

BLANCHARD, D.C. BLANCHARD, R.J. Innate and conditioned reac- tions to threat in rats with amygdaloid lesions. **J Comp Physiol Psychol**. v.81, p.281-290, 1972.

BLANCHARD, D.C. et al. Pharmacological and neural control of anti-predator defense in the rat. **Aggress Behav**, v.16. p.165-75, 1990.

BLANCHARD, P. et al. Analyzing the proximity to cover in a landscape of fear: a new approach applied to fine-scale habitat use by rabbits facing feral cat predation on Kerguelen archipelago. **PeerJ**. 2016 Mar 7;4: e1769. doi: 10.7717/peerj.1769

BLANCHARD, R.J. et al. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav Brain Res**, v.58, p.155-65. 1993.

BLANCHARD, R.J. et al. The Effects of Ethanol and Diazepam on Reactions to Predatory Odors. **Pharmacology Biochemistm & Behavior**. V.35, p. 775-780, 1990.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Ann Rev Psychol**, v.39, p.43-68, 1988.

BOLLES, R.C. FANSELOW, M.S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. **The behavioral and brain sciences**, v.3, p.291-323, 1980.

BOWKER, R.M. et al. Peptidergic neurons in the nucleus raphe magnus and nucleus gigantocellularis: their distribuitions, interrelationships and projections to the spinal cord. **Prog. Brain Res**, v.8, p. 95-128, 1988.

BOWKER, R.M. et al. Descending serotonergic, peptidergic and cholinergic pathways from the raphe nuclei: a multiple transmiter complex. **Brain Res**, v.288, p. 33-48, 1983.

BRANDE-EILAT, N. et al. Acquisition of conditioned fear is followed by region-specific changes in RNA editing of glutamate receptors. **Stress,** v.18, p.309-318, 2015

BULOS, E.M. et al. Behavioral consequences of predator stress in the rat elevated T-maze. **Physiology & Behavior**, v.146, p.28-35, 2015.

CANTERAS, N.S.; GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. **Neuroreport**, v.10, 413-418, 1999.

CAMPION, K.N. et al. Relative Contribution of the Dorsal Raphe Nucleus and Ventrolateral Periaqueductal Gray to MorphineAntinociception and Tolerance in the Rat. Eur J Neurosci, 2016. doi: 10.1111/ejn.13378.

CLARK, F.M.; PROUDFIT, H.K. The projection of noradrenergic neurons in the A7 catecholamine cell group to the spinal cord in the rat demonstrated by anterograde tracing combined with immunocytochemistry. **Brain Res**, v.547, p.279-288, 1991.

COMOLI, E. et al. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. **Behav Brain Res**, v.138, p.17-28, 2003.

DIELENBERG, R.A, Hunt GE, McGregor IS. “When a rat smells a cat”: the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. **Neuroscience**, v.104, p.1085-1097, 2001.

FERRARI, E.A. et al. The functional value of sound and exploratory behaviour in detelencephalated pigeons. **Behav Brain Res**, v.101, p.93-103, 1999.

FIELDS, H.L. et al. The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. **J Neurosci** ; 3: 2545-2552, 1983.

FORCELLI, P.A. et al. Amygdala selectively modulates defensive responses evoked from the superior colliculus in non-human primates. **Soc Cogn Affect Neurosci**, 2016.

GEBHART, G.F. Modulatory effects of descending systems on spinal dorsal horn neurons. In: YAKSH, T.L. (Ed.). **Spinal Afferent Processing**. Plenum: New York, 1986. p. 391-416.

GRAEFF, F.G. Neurotransmitters in the dorsal periaqueductal gray and animal models of panic anxiety. In: Briley M, File SE, editors. **New concepts in anxiety**. London: Macmillan Press, p. 288-312, 1991.

GRAEFF, F.G. et al. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Braz j med biol res**, v.26, p.67-70, 1993.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI JR, H. Animal models of anxiety. In: D’Haenen, Den Boer JA, Willer P, editors. **Biological psychiatry**. New York: John Wiley & Sons; p.1-15, 2002.

GRAY, J.A.; McNaughton N. The neuropsychology of anxiety: **an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system**. 2th ed. Oxford University Press: London; 2000.

HELMSTETTER, F.J. The amygdala is essential for the expression of conditional hypoalgesia. **Behav Neurosci**, v.106, p.518-528, 1992.

HARRIS, J.A. Descending antinociceptive mechanisms in the brainstem: Their role in the animal's defensive system. **J Physiology**, v.90, p.15-25, 1995.

HEGAB, I.M. et al. Defensive responses of Brandt's voles (Lasiopodomys brandtii) to chronic predatory stress. **Physiol Behav**, v.123, p.193-199, 2014.

HITCHCOCK, J.M.; DAVIS, M. Efferent pathway of the amygdala involved in conditioned fear as measured with the fear-potentiated startle paradigm. **Behav Neurosc**, v.105, p.826-842, 1991.

HOLDEN, J.E.; PROUDFIT, H.K. Microinjection of morphine in the A7 catecholamine cell group produces opposing effects on nociception that are mediated by alpha1 and alpha2 adrenoceptors. **Neuroscience**, v.91, p. 979-990, 1999.

IASP- International Association for Study of Pain. **Guide to Pain Management in Low Resource Settings**. Seattle, USA, 2010.

JENSEN, T.S., SMITH, D.F. Effect of emotions on nociceptive threshold in rats. **Physiol Behav**, v.28, p.597-599, 1982.

JENSEN, T.S.; YAKSH, T.L. Spinal monoamine and opiate systems partly mediate the antinociptive effects produced by glutamate at brainstem sites. **Brain res**, v.321, p.287-297, 1984.

JONES, S.L.; GEBHART, G.F. Inhibition of spinal nociceptive transmission from the midbrain pons and medula in the rat: activation of descending inhibition by morphine, glutamate and electrical stimulation. **Brain Res**, v.460, p. 281-296, 1988.

JONES, B.E. et al. GABA-synthesizing neurons in the medula: Their relationship to serotinin-containing and spinally projecting neurons in the rat. **J. Comp. Neurol**, v.313, p. 349-367, 1991.

JONES, S.L. Descending control of nociception. In: LIGHT, A.R. (Ed.). The initial processing of pain and it descending control: spinal and trigeminal systems. **New York: Karger**, p.203-295, 1992.

KAVALIERS, M. Brief exposure to a natural predator, the short-tail weasel, induces benzodiazepine sensitive antinociception in white-footed mice. **Physiol Behav**, v.42, p.29-32, 1988.

KUNZE, A.E. et al. Fear conditioning with film clips: a complex associative learning paradigm. **J Behav Ther Exp Psychiatr**, v.47, p.42-50, 2015.

KROMER, W.; DUM, J.E. Mouse-killing in rats induces a naloxone-blockable increase in nociceptive threshold. **Eur J Pharmacol**, v.63, p.195-198, 1980.

LESTER, L.S.; FANSELOW, M.S. Exposure to a cat produces opioid analgesia in rats. **Behav Neurosci**, v.99, p.756-759, 1985.

LICHTMAN, A.H.; FANSELOW, M.S. Cats produce analgesia in rats on the tail-flick test: naltrexone sensitivity is determined by the nociceptive test stimulus. **Brain Research**, v.533, p.91-94, 1990.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmac ther, v.**46, p.321-340, 1990.

MANTHY, P.W.; HUNT, S.P. Evidence for choclecystokinin-like immunoreactives neurons in the rat medula oblongata which project to the spinal cord. **Brain Res**, v.291, p.49-54, 2002.

MARKS, IM. Fears, phobia and rituals: panic, anxiety and their disorders. **Oxford University Press**: New York,1987.

MARTINS, M.A. et al. Dependency of nociception facilitation or inhibition after periaqueductal gray matter stimulation on the contexto. **Behavioural Brain Research**, v. 214, p. 260–267, 2010.

MICZEK, KA. et al. Escalated aggressive behavior: new pharmacotherapeutic approaches and opportunities. **Ann N Y Acad Sci**, v.1036, p.336-355, 2004.

MINSON, J. et al. Glutamate in spinally projecting neurons of the rostral ventral medula. **Brain Res**, v.397, p.37-46, 1986.

NASHOLD, B.S.J. ET AL. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **J Neurosurg**, v.30, P.14-24. 1969.

PILZ, P.K.; SCHNITZLER, H.U. Habituation and sensitization of the acoustic startle response in rats: amplitude, threshold, and latency measures. **Neurobiol Learn Mem**, v.66, p.67-79, 1996.

PROUDFIT, H.K. Pharmacologic evidence for the modulation of nociception by noradrenergic neurons. **Prog. Brain Res**, v.88, p. 359-372, 1988.

RABINAK C.A, MAREN S. Associative structure of fear memory after basolateral amygdala lesions in rats. **Behav Neurosc**, v.122, p.1284-1294, 2008.

RATNER, S.C. Comparative aspects of hypnosis. In: gordon je (eds.). Handbook of clinical and experimental hypnosis. **New york: macmillian**, p.550-587, 1967.

REIS, F. et al. Role of the hippocampus in contextual memory after classical aversive conditioning in pigeons (C. livia). **Braz J Med Biol Res**, v.32, p.1127-1131, 1999.

REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v.164, p.444-445, 1969.

RODGERS, R.J. RANDALL, J.I. Defensive analgesia in rats and mice. **Psychol Rec**, v.37. p.335-347, 1987.

SCHENBERG, L.C. et al. Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. **Psychopharmacology (Berl)**, v.159, p.138-144, 2001.

SHEPHERD, J.K. et al. The anxiety/defense test battery: influence of gender and ritanserin treatment on antipredator defensive behavior. **Physiology & Behavior**, V. 51, p. 277-285, 1991.

SILVA, B.A. et al. Independent hypothalamic circuits for social and predator fear. **Nature neuroscience**, v.16, p.1731-3, 2013.

SILVA, L.F.S.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Cholinergic modulation of tonic immobility and nociception into NRM of guinea pig**. Physiol. & Behav**, v.87, p. 821-827, 2006.

SIEVERT, T.; LASKA, M. Behavioral Responses of CD-1 Mice to Six Predator Odor Components, **Chemical Senses**, V.0, p.1–8, 2016.

TAUGHER, R.J. et al. ASIC1A in the bed nucleus of the stria terminalis mediates TMT-evoked freezing. **Front. Neurosci**, 2015, Jul 21;9:239. doi: 10.3389/fnins.2015.00239.

URBAN, M.O.; GEBHART, G.F. Supraspinal contribuitions to hyperalgesia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, p. 7687-7692, 1999.

VIELLARD, J. et al. Testing conditions in shock-based contextual fear conditioning influence both the behavioral responses and the activation of circuits potentially involved in contextual avoidance. Behav Brain Res, v.315, p.123-129, 2016.

WIERTELAK, E.P. et al. Learning to activate CCK anti-antinociception: Light cues abolish morphine antinociception. **Science**, v.256, p.830-833, 1992.

WIERTELAK, E.P. et al. Conditioned inhibition of antinociception. **Anim Learn Behav**, v.20, p.339-349, 1992b.

YAKSH, T.L.; RUDY, T.A. Narcotic analgetics: CNS sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques. **Pain**, v.4, p.299-359, 1978.

YAKSH, T.L. Direct evidence that spinal serotonin and noradrenaline terminals mediate the spinal antinociceptve effects of morphine in the periaqueductal gray. **Brain Res**, v.160, p.180-185, 1979.

ZHANG, W.N. et al. The ventral hippocampus and fear conditioning in rats: different anterograde amnesias of fear after infusion of N-methyl-D-aspartate or its noncompetitive antagonist MK-801 into the ventral hippocampus. **Behav Brain Res**, v.126, p.159-74, 2001.

ZHUO, H. et al. Unilateral hippocampal inactivation or lesion selectively impairs remote contextual fear memory**. Psychopharmacology**, 2016, DOI 10.1007/s00213-016-4394-7.

ZHUO, M.; GEBHART, G.F. Spinal serotonin receptors mediate descending facilitation of nociceptive reflex from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in the rat. **Brain Res**, v.550, p. 35-48, 1991.

MARCUS VINICIUS FERREIRA MAGALHÃES - foi professor universitário durante quatros e meio. Possui mestrado em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Sergipe - UFS (2014-2016), sendo pesquisador com bolsa financiada pela Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível de superior - CAPES (2014-2016). Além disso, possui graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade Pio Décimo - Campus I (2013).

LUIS FELIPE SOUZA DA SILVA - possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (2000), mestrado em Fisiologia pela Universidade de São Paulo (2003), doutorado em Fisiologia pela Universidade de São Paulo (2007) e pós doutorado pela University of Iowa. Atualmente é professor associado da Universidade Federal de Sergipe no Campus de Lagarto. Tem experiência na área de Fisiologia, com ênfase em Neurofisiologia, atuando principalmente nos seguintes temas: controle central do comportamento afetivo e defensivo, bases neurais da imobilidade tônica e modulação neural da nocicepção.